

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

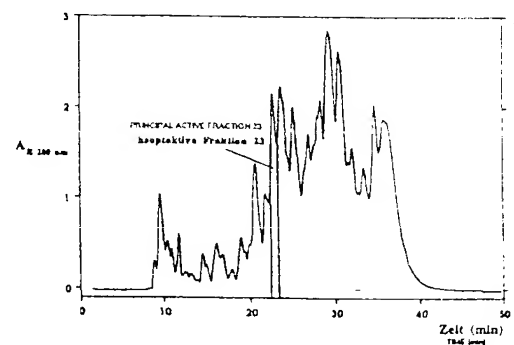
(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 7/00</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/14231</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. März 1999 (25.03.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 40 604.1      16. September 1997 (16.09.97)      DE 198 05 385.1      11. Februar 1998 (11.02.98)      DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).  (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: BIFIDUS STIMULATING PEPTIDES

(54) Bezeichnung: BIFIDOGENE PEPTIDE

(57) Abstract

The invention relates to peptides which are obtainable by mixing cow milk or human milk with proteases followed by a two hour incubation; centrifugation in order to remove milk fat; acidification to a pH of 2.0 by strong acidulation; separating the precipitated proteins; applying at least one reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) step; applying a cationic exchanger HPLC step; collecting fractions; adjusting the fractions to a salt content < 25 mM for executing an activity test by means of dialysis or reverse phase HPLC; cultivating bifidobacterium and e coli in the presence of the fractions and selection of fractions which satisfy condition  $BW/B0 - EW/E0 \geq 0,15$ , wherein BW denotes the bacterial count which is obtained during a 16-hour incubation of bifidobacterium in 50 % elliker broth in the presence of peptides in a concentration of 200 µg/ml, B0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation, EW denotes the bacterial count which is obtained during 16 hour incubation of e coli in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml, E0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation; and isolating the available peptide in said fraction. In addition, the amidated, acetylated, sulphatized, phosphorylated, glycosylated, oxidized derivatives or fragments with bifidus stimulating characteristics and peptides are obtainable by combining the peptides, fragments or derivatives by means of chemical bonding.



# (57) Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden, Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen, Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren, Abtrennung der ausgefallenen Proteine, Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes, Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes, Sammeln von Fraktionen, Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC, Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung: BW/B0 - EW/E0 ≥ 0,15 (bifidogen) genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50 % Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark						

### Bifidogene Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft bifidogene Peptide, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der bifidogenen Peptide.

Von Milch ist bekannt, daß sie fördernd auf den Gesundheitszustand von Säuglingen wirkt. Dies wird vielfach auf den Einfluß der Milch auf die Ausbildung einer säuglingstypischen Darmflora zurückgeführt, die zu mehr als 90% aus *Bifidobacterium bifidum* besteht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es Peptide bereitzustellen, die einen positiven Einfluß auf die Darmflora haben.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Peptide mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Bei den erfindungsgemäßen Peptiden handelt es sich um Peptide, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,

- 2 -

- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt  $< 25$  mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW		
--	-	--	$\geq$	0,15 (bifidogen)
B0		E0		

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  erhalten wird,

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/l}$  erhalten wird,

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids
- sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen Peptide wirken antimikrobiell gegen Bakterien, die in der natürlichen Säuglingsdarmflora nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen und fördern das Wachstums von erwünschten Bakterien wie Bifidobakterien, indem sie die Bifidobakterien im Wachstum stärker als andere Bakterien fördern oder nur die nichterwünschten Bakterien selektiv hemmen. Diese Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, wird als bifidogen bezeichnet.

Bevorzugt werden Peptide eingesetzt, die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

R<sub>1</sub>-EQLLRLKK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-YLEQLLRLKKY-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-NRQRNILR-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-YMNGMNRQRNILR-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-FQWQRNMRK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-HTGLRRTA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-FTAIQNLRK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-EVAARARVW-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-WQRNMRKV-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-LARTLKRLK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-YKQKVEKV-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-LVRYTKKV-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-KYLIEIARR-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWCAVG-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWCAVGE-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>3</sub>-CIAL-R<sub>4</sub> R<sub>3</sub>-CIAL-R<sub>4</sub>

R<sub>1</sub>-YQRRPAIAINNPYVPRITYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-VYQHQAAMPKPWIPKTKVIPYVRYL-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWAAVG-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-CAVGGGCIAL-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-RHTRKYWCRCQARGGCITL-R<sub>2</sub>.

worin

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> unabhängig voneinander NH<sub>2</sub>, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und  
 R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> unabhängig voneinander COOH, CONH<sub>2</sub>, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Bevorzugt weisen R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> eine Länge von bis zu 50, mehr bevorzugt von bis zu 20 und am meisten bevorzugt eine Länge von bis zu 10 Aminosäuren auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch erhalten werden. Alternativ ist jedoch auch die Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder die Herstellung durch chemische Peptidsynthese möglich.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die Nukleinsäuren, die für die bifidogenen Bakterien kodieren, sowie Antikörper, die gegen bifidogene Peptide gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Nucleinsäuren können zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen in Arzneimitteln enthalten sein. Dazu werden bevorzugt galenische Zubereitungen eingesetzt und Applikationsformen gewählt, bei denen die Peptide undegradiert an den Wirkort gelangen.

Vorzugsweise wurden die erfindungsgemäßen Peptide in Mengen von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wirksame Nucleinsäuremengen sind beispielsweise 0,01 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt liegt die Menge im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht für die Peptide und Nucleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zusammen mit Nährstoffen in Nahrungsmittel enthalten sein.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Peptide und/oder die gegen die Peptide gerichteten Antikörper zusammen mit weiteren Hilfsstoffen auch in Diagnostikmittel enthalten sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide und Nukleinsäuren eignen sich zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingte Erkrankungen wie Infektionen, Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies. Die mikrobielle Fehlbesiedlung kann beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien und/oder Plasmodien bedingt sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich auch als Hilfsstoff in der Nahrungsmittelzubereitung im Sinne von Fermentationshilfen.

Es wird insbesondere bevorzugt, daß zwei oder mehr Peptide gemeinsam eingesetzt werden oder Peptide eingesetzt werden, die zwei oder mehr der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen aufweisen. Das unterschiedliche Wirkungsspektrum der Einzelstoffe bzw. Stoffe, die Einzelsequenzen oder erfindungsgemäße Peptide aufweisen, erlaubt es, beim Vorliegen von Resistenzen von Mikroorganismen durch eine geeignete Kombination von Sequenzen oder durch eine Kombination der Einzelsubstanzen eine optimale Hemmung der unerwünschten Mikroorganismen zu erzielen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern:

#### Beispiel 1

##### *Behandlung von Milch*

Humane Milch wurde mit Pepsin (20 mg/g Protein) versetzt, nachdem sie mit HCl auf einen pH von 3,5 eingestellt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und durch Kochen für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 60.000 g bei 4°C) und das MilCHFett abgeschöpft. Die verbliebene Lösung wurde mit 0,1 % TFA versetzt und erneut zentrifugiert, um ausgefallene hochmolekulare Proteine abzutrennen.

##### *HPLC Reinigung eines bifidogenen Peptides aus Milch*

Für die Reinigung von bifidogenen Peptiden aus Milch müssen verschiedene HPLC Trennverfahren miteinander kombiniert werden, um eine möglichst reine Darstellung über eine optimale Trennleistung zu erzielen und inaktive, unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die jeweiligen Proben, die nach jedem Trennungsschritt entstehen, müssen in zwei Testsystemen getestet werden, d.h. ein Wachstumstest mit Bifidobakterien in Kombination mit einem Wachstumstest mit E. coli als Target (siehe Beispiele 3 und 4). Notwendig für die Reinigung ist die Kombination von mindestens einem Reverse-Phase Chromatographieschritt (bevorzugt

von zwei Reverse-Phase Chromatographischritten) und der Einsatz einer Kationenaustausch-HPLC-Trennung. In den Biotest muß die jeweilige Probe salzarm eingesetzt werden, um ein möglichst optimales Screeningergebnis zu erhalten.

Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12,5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 60% B in 45 Minuten

Fluß: 2 ml / min

Detektion 280 nm (siehe Figur 1)

Rechromatografie von Fraktion 23 mit der gleichen Säule und einem flacheren Gradient (siehe Bild):

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B : Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 20% B in 5 Minuten

20 bis 50% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 2)

Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenen Trennschritt mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel, um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA in Methanol

Gradient: 0 bis 40% B in 5 Minuten

40 bis 70% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 3)



- 7 -

Rechromatografie der aktiven Fraktion 21 mit einer Kationenaustausch HPLC:

Säule: Parcasil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, Heidelberg

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer pH 4,5

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Fluß: 0,75 ml/min

Gradient: 0 bis 15% B in 5 Minuten

15 bis 50% B in 35 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 4)

Die erhaltenen Fraktionen wurden jede einzeln in einem kurzen Reverse Phase HPLC Lauf entsalzt, bevor sie zum Test auf antimikrobielle und bifidogene Aktivität zugeführt wurde.

Durch Massenspektrometrie und Aminosäuresequenzierung wurden die folgenden Peptide identifiziert:

Fraktion 9 enthielt die reine, bifidogene Komponente

YQRRPAIAINNPYVPRITYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRRPNLHPSF

(caseinK-63-117)

Fraktion 10 enthält die bifidogene Komponente

GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPICCIQA

(neutrophil-lactoferrin-20-67)

und Fraktion 11 enthält die bifidogene Komponente mit einer Adduktmasse von +16 was darauf hindeutet, daß es sich um ein Oxidationsprodukt handelt (vermutlich ist ein Methionin oxidiert).

Beide Peptide und das Oxidationsprodukt haben eine bifidogene Aktivität.

## Beispiel 2

### *Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf E. coli*

Fraktionen aus der HPLC wurden mit *E. coli* K12 eingesetzt. Der Test wird in 3 g/l Tryptic Soy broth (Sigma) folgendermaßen durchgeführt:

Für jeden Assay wurden Kulturen von *E. coli* K12 frisch in Tryptic Soy broth (Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Bestellnummer T8907) angeimpft (Difco Manual, 10<sup>th</sup> Ed., S. 1027). Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 16 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung, bestehend aus 200 µl 3 g/l Tryptic Soy broth, in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05, gemessen bei 500 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt.

## Beispiel 3

### *Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf Bifidobacterium bifidum*

Für jeden Assay wurden Kulturen von *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 frisch in Elliker broth (Difco, Detroit, USA) (Tryptone 20 g, Yeast Extract (Hefeextrakt) 5 g, Gelatin (Gelatine) 2,5 g, Dextrose 5 g, Lactose (Laktose) 5 g, Saccharose 5 g, Sodium Chloride (NaCl) 4 g, Sodium-Acetate (Natriumacetat) 1,5 g, Ascorbic Acid (Ascorbinsäure) 0,5 g) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter anaeroben Bedingung bei 27°C für 16 bis 18 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer

Testlösung bestehend aus 200  $\mu$ l 50% Elliker broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20  $\mu$ l einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05 gemessen bei 550 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISAREader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente N-acetylglucosamin. Für diesen Test können nur Bifidus-Kulturen eingesetzt werden, die auf N-Acetylglucosamin reagieren. Nach einigen Passagen verlieren Bifidobakterien diese Eigenschaft, diese können dann für diesen Wachstumstest nicht mehr eingesetzt werden.

#### Beispiel 4

Als bifidogen wurden die Fraktionen identifiziert, bei denen der Wert

BW		EW		
--	-	--	$\geq$	0,15 (bifidogen)
B0		E0		

ist.

Patentansprüche

## 1. Peptide erhältlich durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW	
--	-	--	≥ 0,15 (bifidogen)
B0		E0	

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird.

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

E<sub>0</sub> die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phospho-rylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Frag-mente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

2. Peptide gemäß Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz

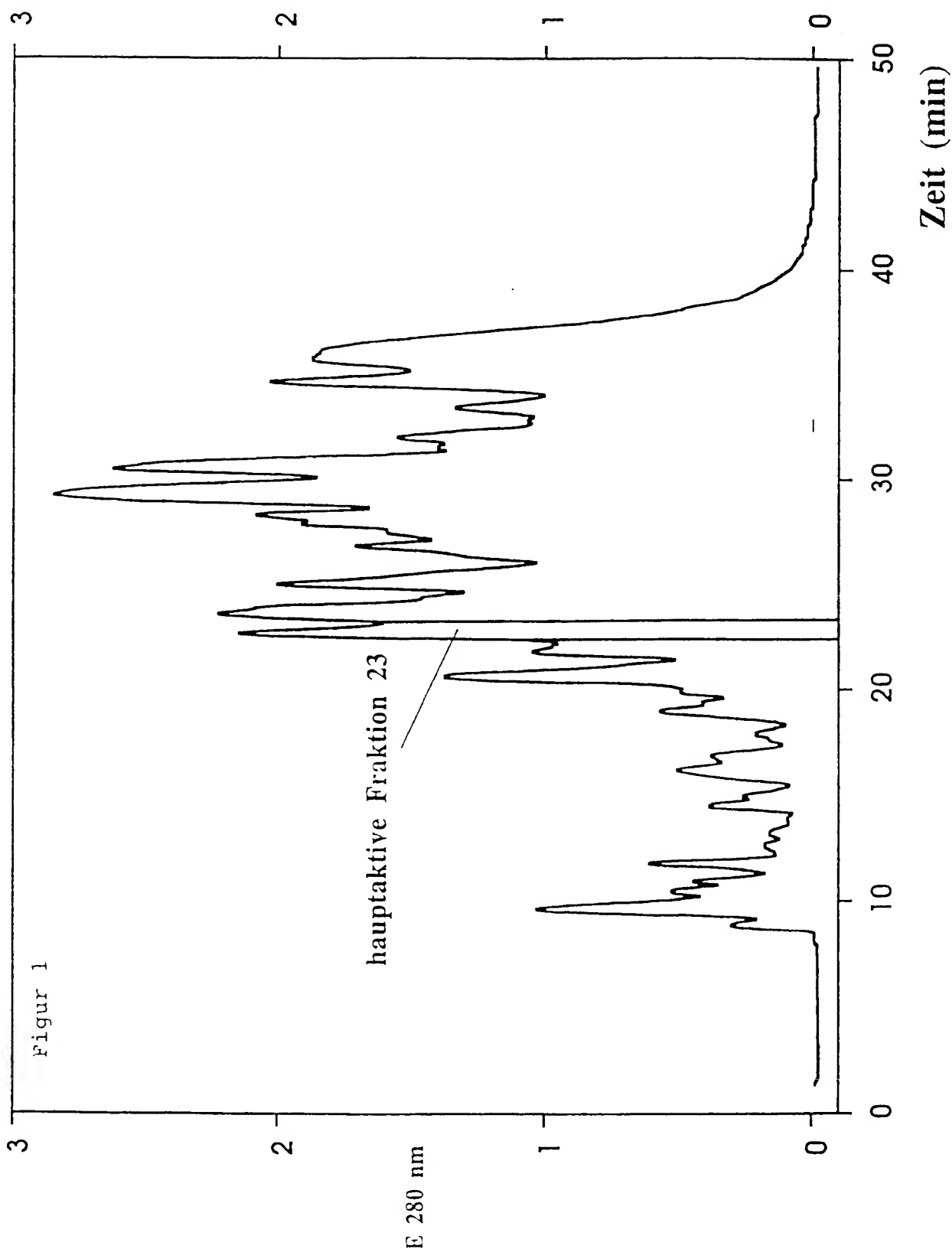
R<sub>1</sub>-EQLLRLKK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-YLEQLLRLKKY-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-NRQRNILR-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-YMNGMNRQRNILR-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-FQWQRNMRK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-HTGLRRTA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-FTAIQNLRK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-EVAARARVW-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-WQRNMRKV-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-LARTLKRLK-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-YKQKVEKV-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-LVRYTKKV-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-KLYEIIARR-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWCAVG-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWCAVGE-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>3</sub>-CIAL-R<sub>4</sub> R<sub>3</sub>-CIAL-R<sub>4</sub>

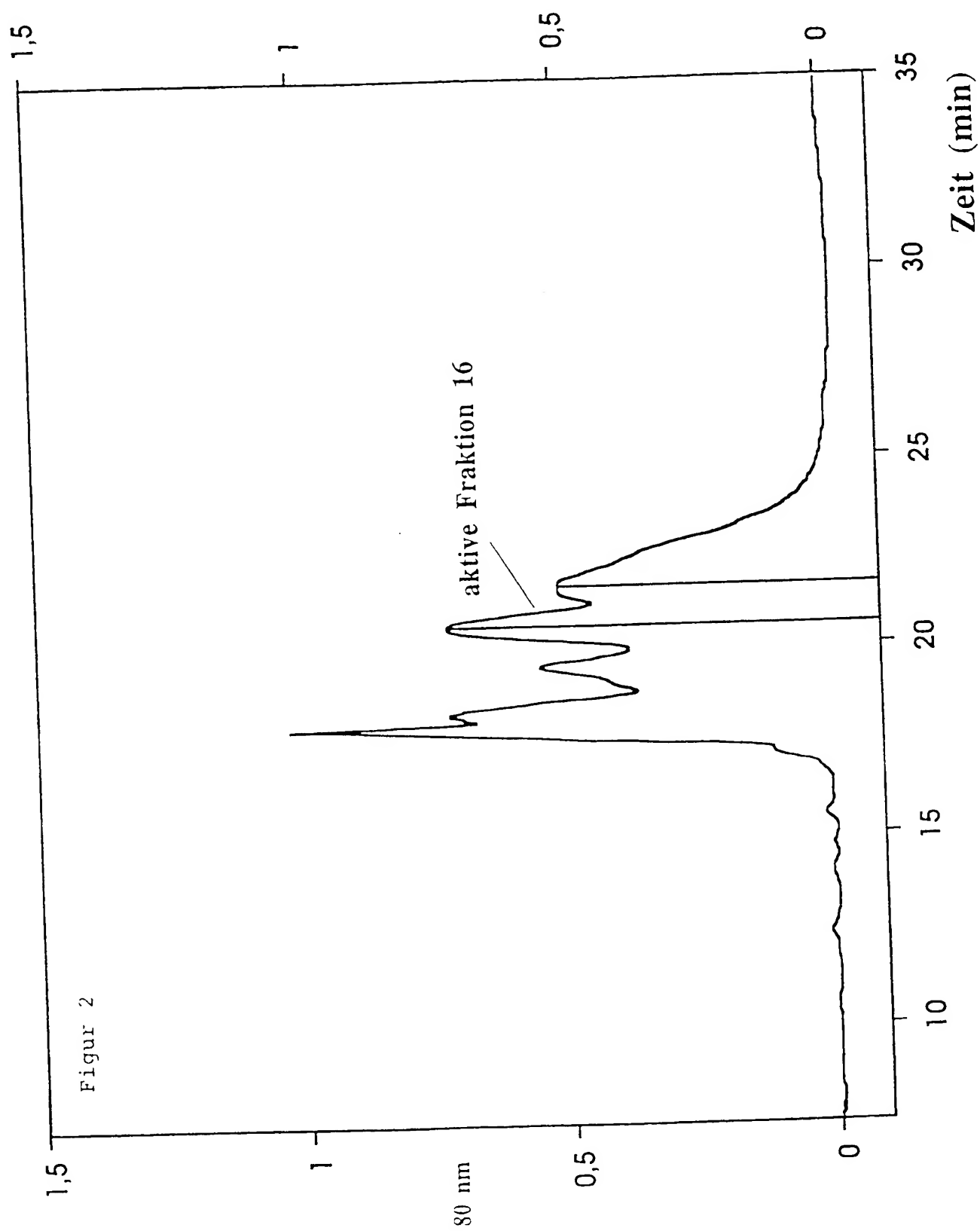
R<sub>1</sub>-YQFRPAIAINNPYVPRTTYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRVRGPPVSCIQRD SPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVVRGPPVSCIQRD SPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVVRGPPVSCIQRD SPIQCIQA-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-VYQHQA KAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL-R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>-ARRARVVWAAVG-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-CAVGGGCIAL-R<sub>2</sub>,  
 R<sub>1</sub>-RHTRKYWCRQGARGGCITL-R<sub>2</sub>.

worin

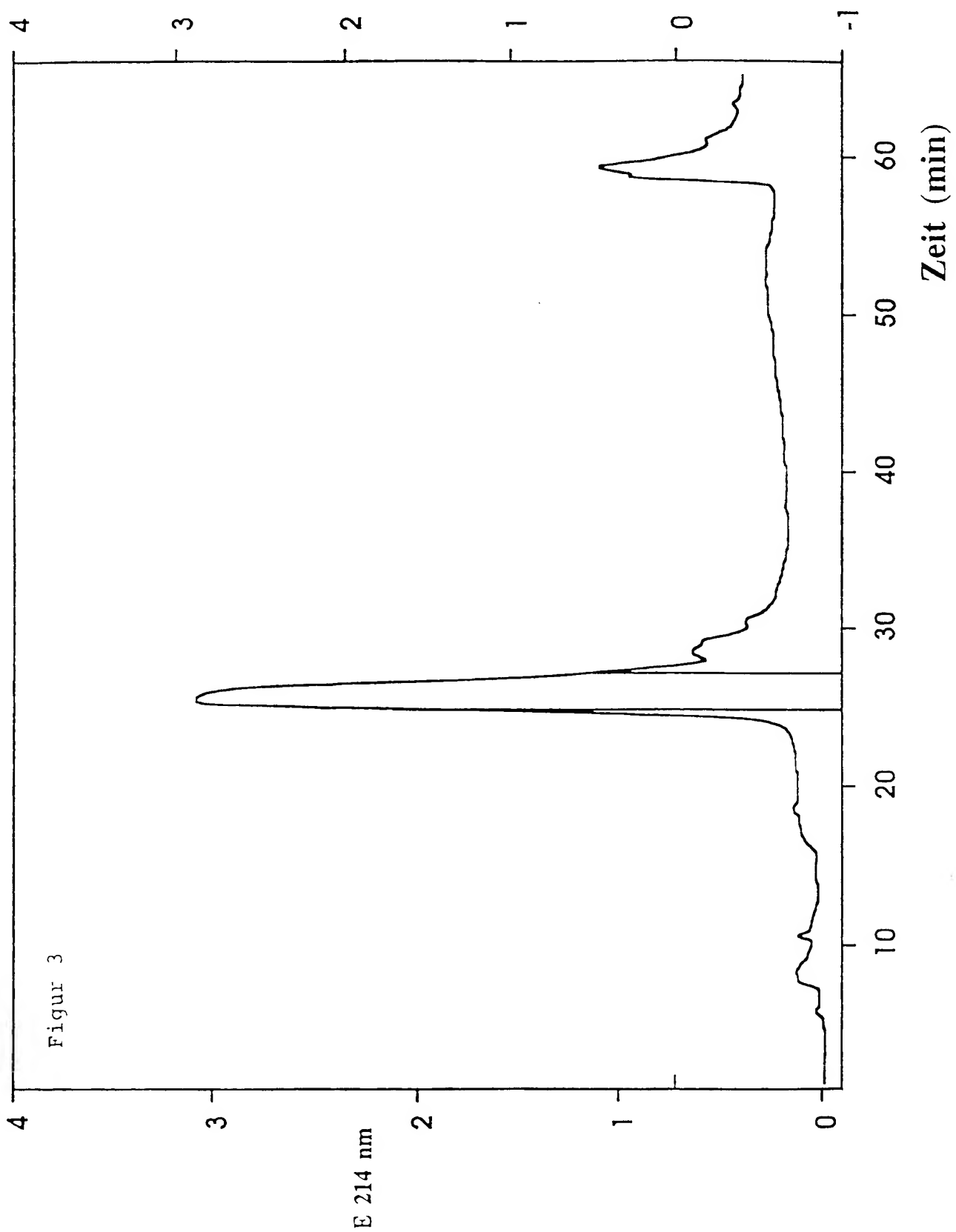
R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> unabhängig voneinander NH<sub>2</sub>, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und  
 R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> unabhängig voneinander COOH, CONH<sub>2</sub>, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylier-ten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

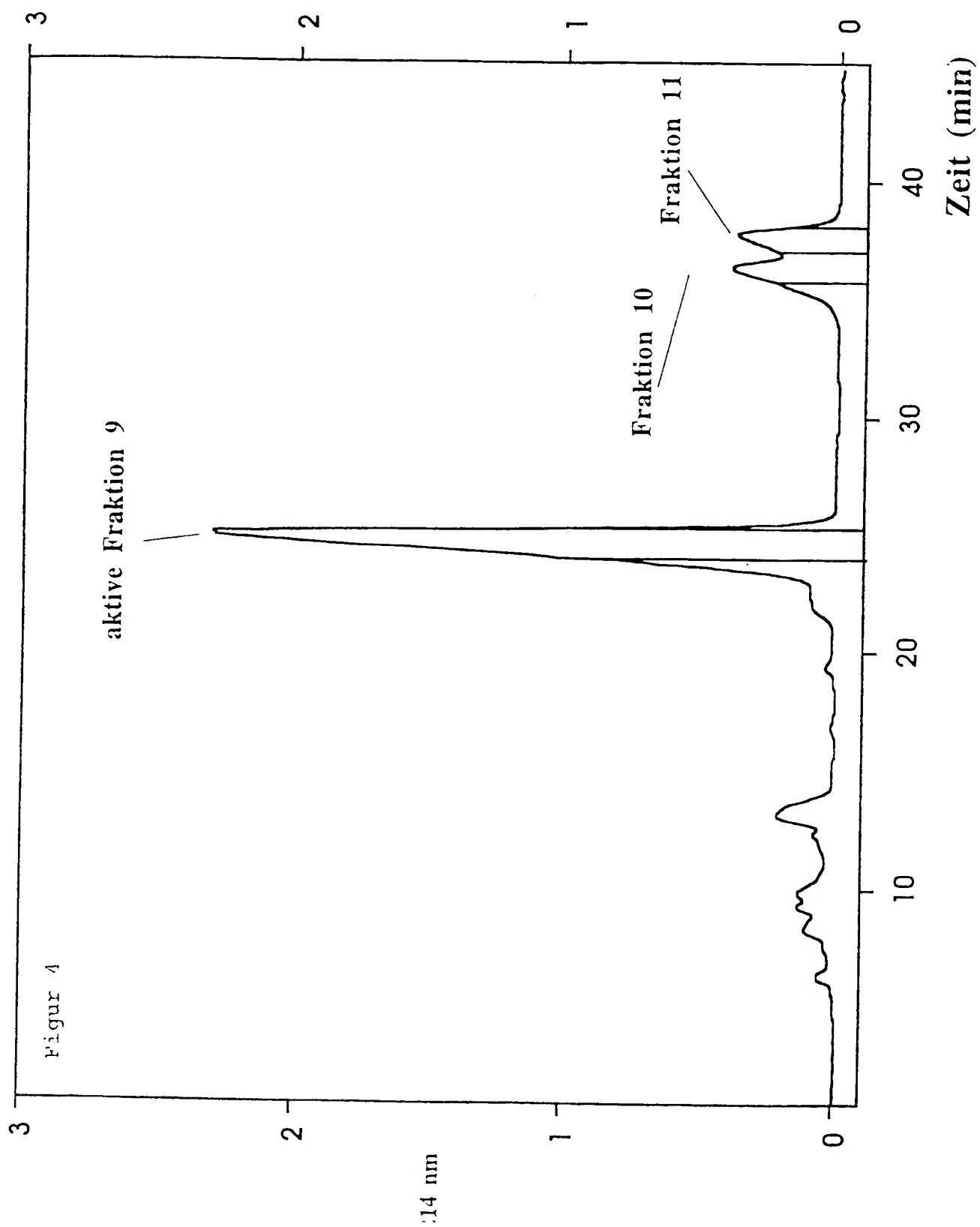
3. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch, Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder chemische Synthese.
4. Nukleinsäuren kodierend für Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
5. Antikörper gerichtet gegen Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
6. Arzneimittel enthaltend mindestens eines der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder mindestens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen.
7. Nahrungsmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zusammen mit Nährstoffen.
8. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 5 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
9. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder der Nucleinsäuren gemäß Anspruch 3 zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
10. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zur Herstellung eines Nahrungsmittels.











## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Bifidogene Peptide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys  
1 5

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr  
1 5 10

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Tyr Met Asn Gly Met Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

3

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Val Ala Ala Arg Ala Arg Val Val Trp  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

4

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Tyr Lys Gln Lys Val Glu Lys Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Cys Ile Ala Leu  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Glu  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 55 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Tyr Gln Arg Arg Pro Ala Ile Ala Ile Asn Asn Pro Tyr Val Pro Arg  
1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Ala Asn Pro Ala Val Val Arg Pro His Ala Gln Ile Pro  
20 25 30

Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Asn Ser His Pro Pro Thr Val Val Arg Arg  
35 40 45

Pro Asn Leu His Pro Ser Phe  
50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Thr Val Ser Gln Pro Glu  
1 5 10 15

Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg Val Arg Gly

6

Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro' Ile Gln Cys Ile Gln  
           35                                  40                                  45

Ala

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Gly Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu Ala  
   1                                  5                                  10                                  15

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
                                   20                                  25                                  30

Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln Ala  
           35                                  40                                  45

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu  
   1                                  5                                  10                                  15

Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly  
                                   20                                  25                                  30

Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln  
           35                                  40                                  45

Ala

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Val Tyr Gln His Gln Lys Ala Met Pro Lys Pro Trp Ile Gln Pro Lys  
1 5 10 15

Thr Lys Val Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu  
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Ala Ala Val Gly  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(3) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Cys Ala Val Gly Gly Gly Cys Ile Ala Leu  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys  
1 5 10 15  
Ile Thr Leu

